

⑤

Int. Cl.:

C 12 d, 13/10

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



⑤

Deutsche Kl.: 6 a, 22/04

⑩

⑪

⑪

⑫

⑬

# Offenlegungsschrift 2 121 397

Aktenzeichen: P 21 21 397.8

Anmeldetag: 30. April 1971

Offenlegungstag: 16. November 1972

Ausstellungspriorität: —

⑬

Unionspriorität

⑭

Datum: —

⑮

Land: —

⑯

Aktenzeichen: —

⑤

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung von Protease durch Kultivierung von Bakterien

⑥

Zusatz zu: —

⑦

Ausscheidung aus: —

⑧

Anmelder:

Godo Shusei Kabushiki Kaisha, Tokio

Vertreter gem. § 16 PatG:

Hoffmann, E., Dr.-Ing.; Eitle, W., Dipl.-Ing.;  
Hoffmann, K., Dipl.-Ing. Dr. rer. nat.; Patentanwälte, 8000 München

⑨

Als Erfinder benannt:

Shimamura, Mutsuo; Onuma, Shinichi; Soka, Saitama;  
Amano, Hidco, Nagareyama, Chiba (Japan)

Prüfungsantrag gemäß § 28 b PatG ist gestellt

DT 2121397

DR. ING. E. HOFFMANN · DIPL. ING. W. EITLE · DR. RER. NAT. K. HOFFMANN  
PATENTANWÄLTE

D-8000 MÜNCHEN 81 · ARABELLASTRASSE 4 · TELEFON (0811) 911087

2121397

GODO SHUSEI KABUSHIKI KAISHA,

Tokio - Japan

Verfahren zur Herstellung von  
Protease durch Kultivierung von  
Bakterien

---

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer alkalischen Protease durch Kultivierung von *Bacillus licheniformis* auf einem geeigneten Kulturmedium, und anschließende Abtrennung der alkalischen Protease aus der Kulturlösung.

Es ist bereits allgemein bekannt, Bakterien der Art *Bacillus subtilis* für die Herstellung einer alkalischen Protease zu verwenden, die ihre optimale Aktivität bei einem hohen pH-Wert aufweist. Es wird hierzu auf die folgenden Literaturstellen

verwiesen: das Buch "Nature", 170, 802 (1952) von N. Ottessen et al; "Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan", 33, 9 (1959) von Fukumoto et al; "Agr. Biol. Chem.", 30, 1261 (1966) von Fukumoto et al; oder "J. Biochem.", 45, 251 (1958) von Hagihara et al. Eine derartige alkalische Protease findet ausgedehnte Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie und in anderen Industrien. Es wird jedoch hier darauf hingewiesen, daß die alkalische Protease unter Verwendung der Stämme von *Bacillus subtilis* hergestellt wird.

Es wurde nunmehr die Aktivität der Enzyme von verschiedenen Bakterienarten untersucht, die aus dem Boden gewonnen wurden. Hierbei wurde festgestellt, daß gewisse Bakterien ein starkes Vermögen zur Erzeugung von Protease besitzen. Die Bakterien wurden auf ihre morphologischen, physiologischen und bakteriologischen Eigenschaften untersucht. Hierbei wurden die Verfahren verwendet, die in dem Buch "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 7. Auflage, angegeben sind. Es wurde gefunden, daß es sich um Bakterien handelte, die zur Art *Bacillus licheniformis* gehörten.

Durch R.W. Bernlohr wird bereits in dem Buch "J. Biol.Chem.", 239, 538 (1964) von einer Protease berichtet, die durch *Bacillus licheniformis* gebildet wurde. Es wird dabei festgestellt, daß die Protease nicht durch Äthylendiamintetraacetat (EDTA) beeinträchtigt wurde, daß sie bezüglich ihrer thermischen Stabilität der durch *Bacillus subtilis* erzeugten Protease ähnlich war, und daß sie ihre Aktivität in dem weiten pH-Wertbereich von 6,0 bis 10,0 entfaltet. Der optimale pH-Wert wurde jedoch nicht angegeben. Von M. Damodaran et al wurde in "Biochem. Biophys. Acta", 17, 99 (1955) von einem Enzym berichtet, das vom *Bacillus licheniformis* abgetrennt worden war.

In diesem Buch wurde festgestellt, daß das Enzym aus Protease mit einem optimalen pH-Wert von 7,4 und aus Peptidase bestand. Durch F. F. Hall et al wurde schließlich in dem Buch "Arch. Biochem. Biophys.", 114, 145 (1966) von einem Enzym berichtet, das vom *Bacillus licheniformis* abgetrennt worden war. Die Autoren stellten fest, daß das Enzym aus zwei Arten Protease und einer Art Peptidase bestand, und daß die Protease in einem Caseinkulturmedium eine optimale Aktivität bei pH-Werten von 7 bis 8 aufwies.

Die Protease, die durch die Erfinder vom *Bacillus licheniformis* abgetrennt und identifiziert wurde, unterscheidet sich von der Protease, von der in den obigen Literaturstellen berichtet wurde, bezüglich ihrer Eigenschaften und insbesondere ihres optimalen pH-Werts, der ein wichtiger Faktor für die Ausnutzung der Wirkung der Protease ist, wenn sie in der Praxis zur Verwendung gelangt. Die Protease, die vom *Bacillus licheniformis* erhalten wurde, und die durch die Erfinder gefunden wurde, zeigt ihre optimale Aktivität bei einem pH-Wert im Bereich von 10 bis 10,5, und zwar sogar dann, wenn Casein, Hämoglobin oder Albumin als Substrat verwendet wird, und aus diesem Grunde ist es klar, daß diese Protease eine alkalische Protease ist. So wird also gemäß der Erfindung eine neue alkalische Protease vorgeschlagen, die durch Kultivierung von Stämmen, die zur Art *Bacillus licheniformis* gehören, erhalten wird. Die neue alkalische Protease hat viele Verwendungen, wie z.B. bei der Herstellung von Nahrungsmitteln, bei der Verbesserung von Meerprodukten, Häuten und Nahrungsmitteln, in der Textilindustrie und bei der Herstellung von Waschprodukten und auch in anderen industriellen Bereichen.

Gemäß der Erfindung kann die alkalische Protease dadurch hergestellt werden, daß man Bakterien des Stammes *Bacillus licheniformis* (FERM-P Nr. 387, ATCC Nr. 21471) auf herkömmlichen Kulturmedien kultiviert, wobei sich die genannte

BAD ORIGINAL

209847/0930

alkalische Protease im erhaltenen Kulturmedium ansammelt, und daß man hierauf die alkalische Protease aus dem Kulturmedium in an sich bekannter Weise gewinnt.

Der verwendete Stamm wurde sowohl beim Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science & Technology in Tokio (Hinterlegungs-Nr. FERM - P Nr. 387) als auch bei der American Type Culture Collection in Rockville (ATCC Nr. 21471) hinterlegt.

Die folgenden Komponenten werden im Kulturmedium verwendet: Glukose und Stärke als Kohlenstoffquelle; Pepton und Casein als Stickstoffquelle; natürliche Nährstoffe, wie z.B. Hefeextrakte und Fleischextrakte; sowie anorganische Salze. Es können aber auch ein Extrakt eines entfetteten Sojabohnenkuchens, Reiskleie und Maiskleie als natürliches Kulturmedium verwendet werden.

Es wird bevorzugt, eine Kulturtemperatur von 30 bis 35°C bei einem pH von ungefähr 7 unter Belüftung 40 bis 72 Stunden lang aufrechtzuerhalten, um die maximal aktive Protease zu erzielen. Die maximale Aktivität kann bei 35°C während eines Zeitraums bis zu 40 Stunden erhalten werden.

Die alkalische Protease, die sich in der Kulturlösung ansammelt, wird dadurch gereinigt, daß aufeinanderfolgend die in der Folge angegebenen Schritte ausgeführt werden: Entbakterisierung, Konzentrierung, Aussalzung, Dialyse, Entfärbung, Kolonnenchromatographie unter Verwendung einer Ionenaustausch-cellulose und eines Ionenaustausch-Sephadex, und Gelfiltrierung.

Nun werden die Zeichnungen erläutert.

Fig. 1 zeigt das Chromatogramm, welches dadurch erhalten wird, daß die Kulturlösung einer Entbakterisierung, Aussalzung, Dialyse und Entfärbung unterworfen wird, um eine gereinigte alkalische Protease einer Kolonnenchromatographie durch Carboxymethylcellulose unterworfen wird. In Fig. 1 zeigt die Kurve 1 die Proteinkonzentration, die Kurve 2 zeigt die Aktivität der Protease, und die gerade Linie 3 zeigt die Natriumchloridkonzentration. Wie in Fig. 1 gezeigt ist, ist die Aktivität der Protease in der Spitzenfraktion C konzentriert. Die Aktivität einer kleinen Proteasemenge kann in der Fraktion D beobachtet werden. Die Protease, die in der Fraktion C konzentriert ist, ist die alkalische Protease von *Bacillus licheniformis*, die durch die Erfinder gefunden wurde. Es wurde im übrigen keine Fraktion gefunden, die die Proteaseaktivität wie in Fig. 1 zeigt. Diese Tatsache läßt erkennen, daß die Reinigung der rohen Protease leicht durchgeführt werden kann und daß durch die Erfindung in vorteilhafter Weise alkalische Protease hergestellt werden kann.

Die Charakteristiken der alkalischen Protease, die gemäß der Erfindung hergestellt worden ist, sind in den Figuren 2 bis 5 gezeigt. Fig. 2 zeigt im Zusammenhang zwischen der Aktivität der alkalischen Protease und dem pH-Wert. Wie in Fig. 2 zu sehen ist, liegt der optimale pH-Wert im Bereich von 10 bis 10,5, wenn Casein als Substrat verwendet wird, und dieser optimale pH-Wert ändert sich auch nicht, wenn Hämoglobin oder Albumin als Substrat verwendet wird. Fig. 3 zeigt den Zusammenhang zwischen der Aktivität der alkalischen Protease und der Temperatur. In Fig. 3 zeigt die Kurve 1 die Aktivität der alkalischen Protease, wenn das Substrat Calciumacetat in einer Menge von  $5 \times 10^{-13}$  Mol enthält. Die Kurve 2 zeigt die Aktivität der alkalischen Protease, wenn das Kulturmedium kein Calcium-

acetat enthält. Die Fig. 3 zeigt, daß die optimale Kulturtemperatur bei 60° C zu finden ist und daß die Protease bei 80° C deaktiviert wird. Die Aktivität der Protease wird bemerkenswert erhöht, wenn Calciumacetat im Reaktionsgemisch enthalten ist, wie dies durch die Kurve 1 dargestellt ist, aber die optimale Kulturtemperatur wird nicht wesentlich verändert.

Die Aktivität der alkalischen Protease wurde durch ein Verfahren getestet, das im Buch "Method for the Investigation of Enzyme", Band 2, Seite 240 von Hagihara (gedruckt durch Asakura Bookshope) angegeben ist. Die Protease wurde mit einer Lösung, die Casein ethielt, bei einem pH-Wert von 10,0 und bei einer Temperatur von 30° C gemischt. Das Casein wurde in Tyrosin hydrolisiert und das nicht-hydrolisierte Casein wurde unter Verwendung des Fällungsmittels B ausgefällt, bei welchem es sich um ein Gemisch aus 0,11 Mol  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ , 0,22 Mol  $\text{CH}_3\text{COONa}$  und 0,33 Mol  $\text{CH}_3\text{COOH}$  handelt. Das Filtrat wurde auf die Lichtabsorption bei 257 m $\mu$  geprüft. Die Aktivität der Protease wird durch die "Einheit" angegeben, bei der es sich um die Menge Tyrosin ( ) handelt, die in einer Minute gebildet wird.

Fig. 4 zeigt die thermische Stabilität der alkalischen Protease. In Fig. 4 zeigt die Kurve 1, daß die Protease bei einer Temperatur bis zu 55° C 15 Minuten lang stabil ist, wenn das Reaktionsgemisch Calciumacetat in einer Menge von  $5 \times 10^{-1}$  Mol enthält und ein pH von 10,0 verwendet wird. Die Kurve 2 zeigt, daß die Protease bei einer Temperatur bis zu 50° C stabil ist und daß die Aktivität der Protease bei einer Temperatur oberhalb 55° C rasch verringert wird, wenn das Kulturmedium kein Calciumacetat enthält, aber im übrigen unter den gleichen Bedingungen wie bei Kurve 1 gehalten wird.

Fig. 5 zeigt den Zusammenhang zwischen der Aktivität der alkalischen Protease und dem pH-Wert, wenn das Reaktionsgemisch 22 Stunden auf 30°C gehalten wird. Die Kurve 1 zeigt die Aktivität der Protease, wenn das Reaktionsgemisch Calciumacetat in einer Menge von  $5 \times 10^{-3}$  Mol enthält, und die Kurve 2 zeigt die Aktivität der Protease, wenn das Reaktionsgemisch kein Calciumacetat enthält. Aus den Kurven 1 und 2 geht hervor, daß die Protease bei einem pH-Wert im Bereich von 5,0 bis 11,0 stabil ist.

Die Aktivität der alkalischen Protease der vorliegenden Erfindung wird durch Schwermetallionen, wie z. B. Hg- und Cu-Ionen und insbesondere durch Oxydationsmittel, wie z.B. Jod oder Diisopropylfluorophosphat (DEP) und Kartoffelinhibitor (potato-inhibitor) beeinträchtigt. Die Aktivität der alkalischen Protease wird jedoch nicht durch Reduktionsmittel, wie Cystein, Chelierungsmittel wie EDTA, Monojodessigsäure und einem SH-Reagenz beeinträchtigt.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1

*Bacillus licheniformis* (FERM-P 387, ATCC Nr. 21471) wurde in 1 l eines wäßrigen Kulturmediums (pH = 7,2) inkubiert, welches 1 % Glucose, 1 % Pepton, 0,1 % Hefeextrakt, 0,2 % Natriumchlorid, 0,2 % Calciumchlorid, 0,05 % Kaliumphosphat, 0,01 % Magnesiumsulfat und 0,001 % von jeweils Eisen(II)-sulfat und Mangansulfat enthielt. Der *Bacillus licheniformis* wurde unter Schütteln bei 30°C 72 Stunden lang kultiviert. Das erhaltene Kulturmedium enthielt die alkalische Protease, die eine



Aktivität von 1.930 Einheiten je ml aufwies. Das Kulturmedium wurde durch Verwendung einer Zentrifuge oder eines Filters entbakterisiert, und dann wurde das Filtrat mit einer zu 80 % gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat gemischt, und das Gemisch wurde ausgesalzt und dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde durch eine Kolonne hindurchgeführt, die mit Duolite A-2-Harz (oder einem Anionenaustauschharz) bepackt war, um Färbestoffe abzutrennen. Die entfärbte Lösung wurde einer Kolonnenchromatographie unterworfen, wobei Carboxymethylcellulose und DEAE-Sephadex verwendet wurde. Hierauf wurde die rohe Protease durch das Gelfiltrierungsverfahren unter Verwendung von Sephadex-75 abgetrennt, und die rohe Protease wurde durch ein Ausfällungsverfahren behandelt, wobei Aceton verwendet wurde, um die gereinigte Protease herzustellen. Die gereinigte Protease wurde getrocknet und gewogen. Es wurden 47 mg getrocknete Protease mit einer Aktivität von 4.110 Einheiten je mg erhalten.

#### Beispiel 2

*Bacillus licheniformis* des in Beispiel 1 angegebenen Stammes wurde in 1 l eines Kulturmediums (pH = 7,2) inkubiert, welches einen Extrakt enthielt, der durch Extrahieren von entfettetem Sojabohnenkuchen mit einer Lösung, die 4 % Alkali und 1 % lösliche Stärke enthielt, erhalten worden war. Der *Bacillus licheniformis* wurde 40 Stunden lang bei 35° C unter Belüftung und Rühren kultiviert. Das erhaltene Kulturmedium enthielt die alkalische Protease, die eine Aktivität von 4.400 Einheiten je ml aufwies. Das Kulturmedium wurde in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 behandelt, wobei 1,07 g der gereinigten Protease erhalten wurde, die eine Aktivität von 4.110 Einheiten/mg aufwies.

P a t e n t a n s p r u c h

Verfahren zur Herstellung einer alkalischen Protease, dadurch gekennzeichnet, daß man Bakterien des Stammes *Bacillus licheniformis* (FERM - P Nr. 387, ATCC Nr. 21471) auf herkömmlichen Kulturmedien kultiviert, wobei sich die genannte alkalische Protease im erhaltenen Kulturmedium ansammelt, und daß man hierauf die alkalische Protease aus dem Kulturmedium in an sich bekannter Weise gewinnt.

FIG. 1

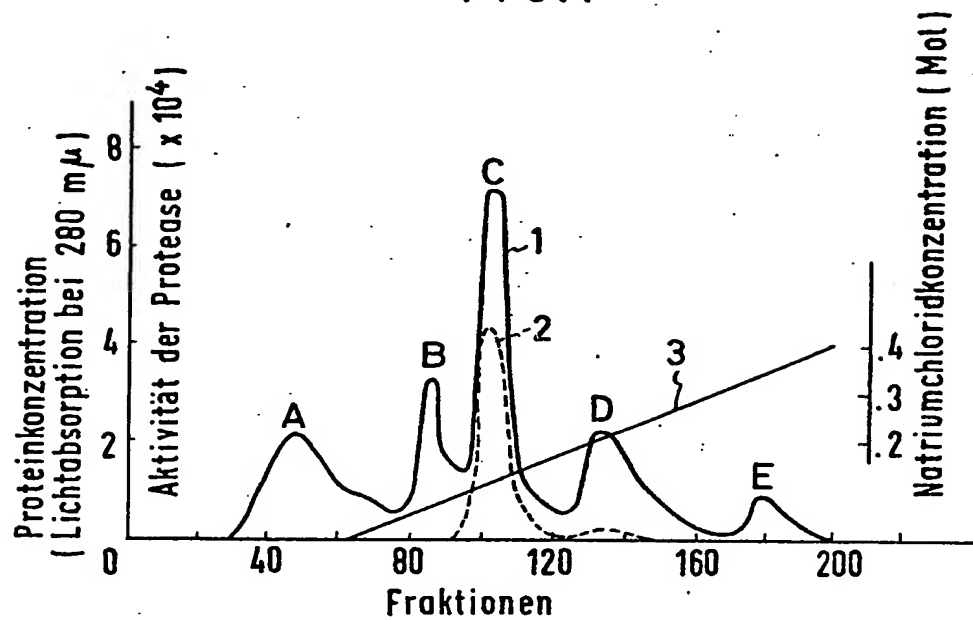
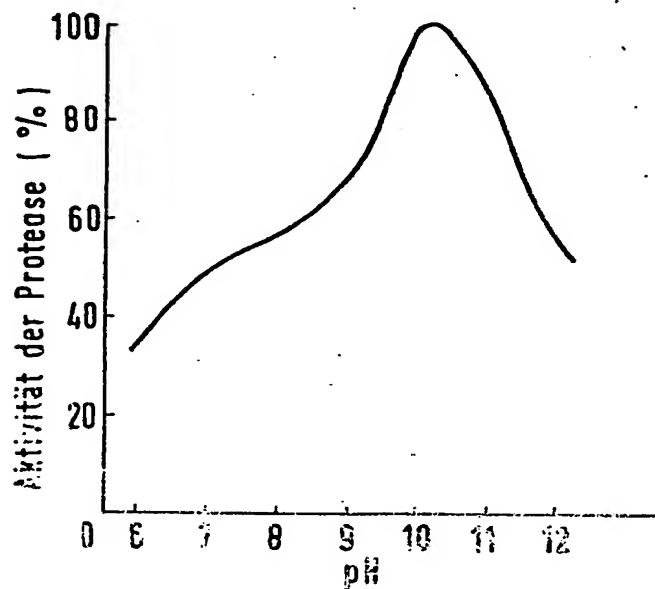


FIG. 2



209847/C930

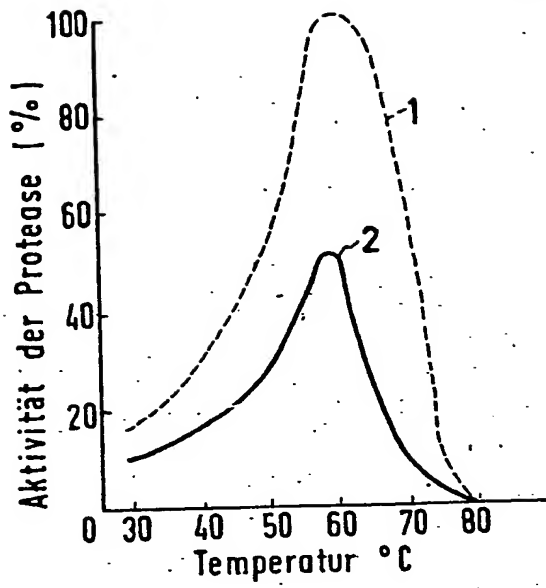


FIG. 3

FIG. 4

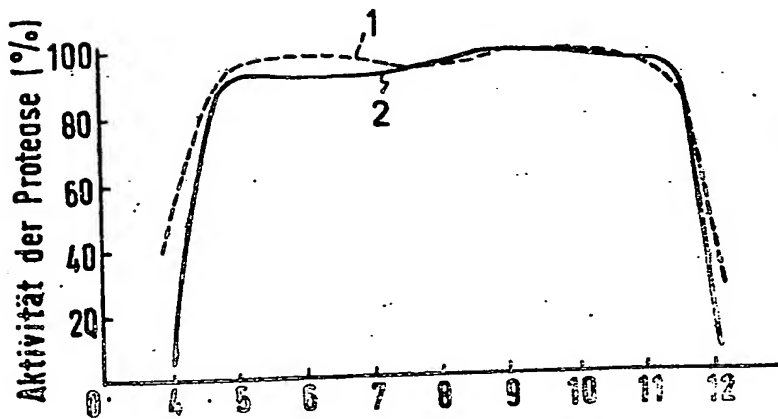
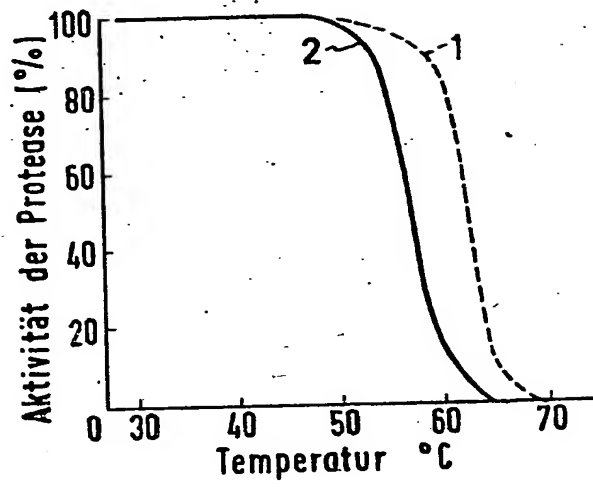


FIG. 5